

グルタミン酸脱炭酸酵素の組織化学的 証明法の研究

(京都大学結核研究所所長 植 田 三 郎)

(病理学部教授 高 松 英 雄)

東 日 出 夫

(昭和34年12月11日受付)

I 緒 言

脱炭酸酵素とは、衆知のごとく、カルボキシル基を分解して炭酸ガスを発生する反応を触媒する酵素であるが、これには、 α アミノ酸の分解に関与するものと、 α ケトン酸の分解に関与するものとに、二大別され、前者はピリドキサルリン酸を補酵素とし、後者はアノイリンピロリン酸とコエンチームAを補酵素とする。著者はこれら一連の酵素の組織化学的証明法を研究するにあたって、基質の最も入手し易く、至適pHの中性付近にある動物組織のグルタミン酸脱炭酸酵素を選んだ。

グルタミン酸脱炭酸酵素は、1937年奥貫³⁶により発見された酵素で、当時の記載によると、グルタミン酸とピロリドンカルボン酸にのみ特異的に作用して、酸素を消費することなく、炭酸ガスを発生せしめ、その他のアミノ酸、 α ケトン酸には作用せず、至適pHは6付近にあり、山百合の花粉、人参、大根、菠蓮草等の高等植物においてその存在が、検索され、とくに山百合の花粉のものは、顕著な活性が示されることが述べられている。高等植物における本酵素の分布は、1946年、Schales⁵⁴ et. al. により、さらに広汎に研究され、とくに南瓜は本酵素を抽出、精製するに好まぬ資料であることが示された。1938 Virtanen⁶⁷ et. al. は、legume bacteriq の中にグルタミン酸を分解して炭酸ガスを発生する酵素の存在する事実を認め、分解酸物である γ アミノ酪酸を金塩として分離している。その後、各種細菌、とくに大腸菌により、

種々の実験がなされているが、1955年、Hac,¹¹ はカゼイン水解物の培地上に発育しつつある大腸菌に、グルタミン酸と葡萄糖を追加して数時間培養を続けた資料から高単位のグルタミン酸脱炭酸酵素の標品を得ている。1954—1955年、Møller³¹ は671株の腸内細菌で各種のアミノ酸脱炭酸酵素に就て検討し、これら諸酵素についての種属特異性を論じている。1955年、Shaw⁵⁸ et. al. は、153種の Coliforme bacteria と63種の変型菌について検討し、凡ての変型菌に1-アミノ酸酸化酵素とグルタミン酸脱炭酸酵素の存在していることを記載している。1950年 Awapara¹ et. al. および、Robert & Frankel⁴³,⁴⁵ は別個に脳の遊離アミノ酸を濾紙クロマトグラムで検索中、そのスポットの中に γ -アミノ酪酸を発見し、動物組織内にグルタミン酸炭酸酵素の存在することを考察し、とくに、Robert & Frankel⁵⁵ は、放射性同位元素である C^{14} でラベルしたグルタミン酸中に脳のアセトン乾燥粉末を加えて酵素反応を行い、反応後の液の濾紙クロマトグラムで放射能はグルタミン酸の他はほとんどが γ -アミノ酪酸のスポットに出現する結果を得、グルタミン酸 $\rightarrow$ γ -アミノ酪酸の経路を確認した。その後、Wingo & Awapara と Robert & Frankel⁴⁶,⁴⁷ により、脳における上記経路の詳細な酵素化学的な研究が行なわれ、多くの点で他種のアミノ酸脱炭酸酵素と共通の性質を記載されている。脳以外の諸臓器における本酵素の存在は、Robert & Frankel は微弱ではあるが、肝臓、腎臓および

筋組織にこのような活性のあることを述べているが、Werle⁶⁹⁾ & Brüninghaus, Bergerett⁴⁾ et al. および, Davison⁵⁾ はその存在を否定している。

1944年, Gale & Epps^{B4, B5} および Epps^{B3)} は大腸菌と, *Streptococcus faecalis* から抽出したアルギニンならびにチロジンの脱炭酸酵素を透折により失活させた標品を賦活せしめる物質について検討したが, その当時までに知られているすべての補酵素は, 上記の賦活作用に関して最も有効であつた Brewer のイースト菌から有効物質の抽出, 精製を行ない, 該物質に対してコデカルボキシラーゼと名附けた。この研究とは別に, 1944年, Snell^{B18)} は, ピリドキシンを含まない培地上に発育している乳酸菌の中に, ピリドキシン自身よりさらに顕著に発育促進効果を有する物質を認め, これがピリドキシンの酸化された物質とアミノ化された物質であることを識り, 同時に氏の協同研究者であつた Harris^{B9)} et. al. は, 該物質の化学構造についてピリドキシンの有する2個のヒドロキシメチル基の中4位の基の酸化または, アミノ化を受けた物質が有効であることを確認した。同年, Gunsalus & Bellamy^{B7)} は, Snell のピリドキサルとピリドキサミンについて, *Streptococcus faecalis* のチロジン脱炭酸酵素作用におよぼす影響を研究して, ピリドキサミンは無効, ピリドキサルは反応後10分を経ってから活性の増強が見られた。さらに, Gunsalus, Bellamy & Umbreit はピリドキサルに A. T. P. を加えることにより活性が顕著に増強される事実を得, ついで試験管内で, ピリドキサルの3位の一級アルコール基を磷酸エステル化させた物質に就いてそのチロジン脱炭酸酵素におよぼす影響が, A. T. P. +ピリドキサルに一致した顕著な活性増強作用を示すことを認め, ピリドキサル磷酸が α -アミノ酸脱炭酸酵素の補酵素であることを主張した。1945年, Umbreit & Gunsalus⁶⁴⁾ はグルタミン酸ならびにアルギニンの脱炭酸過程においてピリドキサル磷酸が, 補酵素としての作用を有する事実を記載し, 同年, Baddiley & Gale¹⁾ は, リジン, チ

ロジン, アルギニンの脱炭酸反応に前年, Gale & Epps の精製したコデカルボキシラーゼと, 合成により得られたピリドキサル磷酸のおよぼす影響を検討して, 両者は一致せる賦活作用を示すことを記載した。1950年, Robert & Frankel⁴⁵⁾ は脳のアセトン粉末のグルタミン酸脱炭酸実験において, その反応液中に微量の弗素イオンの存在下で, ピリドキサル + A. T. P. はピリドキサル磷酸と同様な効果を来す成績を得, 動物体内でピリドキサルがその磷酸エステルにまで合成し得ることを証明した。1953年, Huruwitz^{B10)} は, ピリドキサルが A. T. P. の存在下に 磷酸エステル化反応を触媒する酵素をイースト菌から抽出精製してピリドキサルキナーゼと名附けている。

1955年, Steenholt⁶²⁾ et. al. は, D. O. P. A. とグルタミン酸の脱炭酸酵素は, -SH 反応示薬で阻碍を受け透折した酵素標品では, 金属イオンがコファクターとなることから, これら脱炭酸酵素は機能的な-SH 基を有するものであると述べ, 1956年, Davison⁵⁾ もまたグルタミン酸, チス테인酸およびチス테인スルフィン酸の脱炭酸酵素において, -SH 基が本質的な機能を有するものであると述べ, 同年, Bergerett⁴⁾ et. al. は, 上記3酵素はその減弱した状態においては, チス테인と2-3-ジメルカプトプロパンノールは, その活性を補助する作用が認められるが, ピリドキサル磷酸と共に用いた場合には阻止的な結果が見られる故に, -SH 基は補酵素と結合するのであらうとの見解を発表している。

本酵素はきわめて基質特異性の強い酵素であることが知られている。1951年, Robert⁴⁴⁾ & Frankel は 1- グルタミン酸と類似の化学構造を有する物質, すなわち d- グルタミン酸, グルタミンおよび α -ケトグルタル酸について調べた結果では, これらのすべてが脱炭酸を受けることなく特に d- グルタミン酸は阻碍作用のあることを記している。至適 pH- は細菌および下等植物では 4.5~5.0, 高等植物では 5.5~6.5 であり, 動物組織のものは, Wingo & Awapara は, 6.8, Robert & Frankel⁴⁷⁾ は,

6.4~6.5 と記載している。前者は鼠腦の新鮮ホモジエネートを用い、判定には γ アミノ酪酸の定量に主体性をおき後者は甘口鼠の腦のアセトン粉末を用いてピリドキサル燐酸添加反応液において検索され、判定は発生する炭酸ガスの定量に依存している。

本酵素が-CN 基により強く阻 碍 されることはすでに、1937奥貫³⁶⁾により記載されているが、この事実は、他種のアミノ酸脱炭酸酵素にも汎く認められるところであり酵素中に作用簇として存在している金属を捕捉することによるものと思われていた。しかしながら1940年、

Werle^{B21)} はカルボニル基を捕捉する作用を重視し、Girard & Sandolescu^{B6)} の述べたケトン示薬をヒスチデン脱炭酸酵素の反応液に加えて、そのすべての示薬において阻 碍 作用のあることを記した。グルタミン酸脱炭酸酵素については1942年奥貫³⁷⁾ がケトン示薬で阻 碍 されることを記している。鼠腦においては、1950年、Wingo & Awaapara⁷⁰⁾ が同様な実験を行つて阻 碍 最終濃度々表Ⅱのごとくに記載している。

Ⅱ 実験材料ならびに実験方法 新鮮凍結切片の作製

第Ⅰ表 グルタミン酸脱炭酸酵素の至適PH

発 表 者	発 表 年	p H 値	資 料	文 献
Axelrod. B et. al.	1955	5.6 37°C 6.5 15C	レモン オレンジ	2
Beeves, A.	1951	76-2中で 作用する	大麦	3
Hood, S. L.	1954	6 近辺	南瓜, 大根	13
Okunuki, K.	1937	5.2-5.5	山百合の花粉	36
Okunuki, K.	1952	5.6-5.5	南瓜	40
Rohrlich, M.	1957	5.6-27°C	穀類	50
Schales, O. et. al.	1946	5.5-50	種々の高等植物	55
Najjar, V. A. et al.	1954	45	大腸菌	
Krishnaswamy, P. R. et. al.	1956	4.8~5.2	イースト菌 Rhodotorula glutinis	22
Schormüller, J. et. al.	1955		酸性チーズ	59
Wingo, W. & J. Awapara	1950	6.8	鼠腦, 新鮮ホモジエネート	70
Robert. E. & S. Frankel	1951	6.4-6.5	マウス腦, アセトン粉末 ピリドキサル燐酸を添加して測る	47

第Ⅱ表 ケトン示薬のグルタミン酸脱炭酸酵素作用を阻止する最終濃度
文献 (70) より

阻 碍 剤	最終濃度(mcl/l)	阻 止
Cyanide	1×10^{-4}	48%
Hydroxylamine	1×10^{-4}	52%
Semicarbazide	1×10^{-4}	23%

成熟鼠を断首により屠殺し、腦、肝臓、腎臓、副腎、胃、肺臓、心臓、大腿直筋を剔出した。摘出された臓器は直ちに凍結を行うため、屠殺前に水道水を入れた金属罐を-15° C~-20° C の冷凍器内に入れ数時間放置して置くと

罐内容は硬く結氷する。この罐壁に臓器片を附着させて再び冷凍器に入れ、15分~30分間放置すると組織塊は帯白色の硬い塊と化し、小刀の尖で容易に剥離することが出来る様になる。剥離した臓器塊を予め冷却された木のブロックに冷凍器内で水を以て固着せしめ、次で冷凍器内でユング型のマイクロームを以て厚さ20ミクロンの切片を作製して被覆硝子に貼布する。薄切時の温度は臓器の種類に従つて異なるも-17° C から-7° C の間である。

加熱対照標本

新鮮凍結切片を蒸気釜の中で30分加熱して作

成する。水蒸気の影響を防ぐため被覆硝子に貼布された新鮮凍結切片を金属容器の中に入れて密閉し、容器ごと蒸気釜中に入れて加熱した。

炭酸脱水酵素粗標品の作製

Meldrum & Roughton, および Keilin & Mann の方法を参照とした。すなわち枸橼酸ソーダ混合血液 500cc, を遠心沈降器で3500/分回転30分間操作して赤血球を分離し、これを洗滌する目的で、ほぼ同量の生理的食塩水と混和および遠沈を3回繰り返す。硝子小球を容れた 1000c.c. のコルペン中に洗滌された赤血球を入れ、さらにこれと同量の冷却された蒸留水を注いで溶血させ、次いで血色素を凝固、除去する目的でコルペンを好く振盪しながら95%アルコールとクロロフォルムとを180:13の比率に混合した液の資料とほぼ同量を注入し、終了後も大約5分位振盪を続ける。その後冷蔵庫中に放置して血色素を完全に変質させる。すなわち、この操作で資料は赤色調を完全に失い、褐色の凝固物と化する。次いで濾紙の表面を硝子綿で保護した濾斗にて凝固した血色素を除去すると淡黄色透明の液が得られる。濾紙上に残った凝固物はよく粉碎して再びアルコール、クロロフォルム混合液にて抽出する。かくして得た濾液を有機溶媒除去の目的で膀胱膜を用いて一昼夜流水中に透折し、次で、凍結乾燥を行い帯褐白色の粉末を得る。この物質は塩化カルシウム入りの2重ビンに容れ、冷蔵庫内に保存する。

基質液の作成

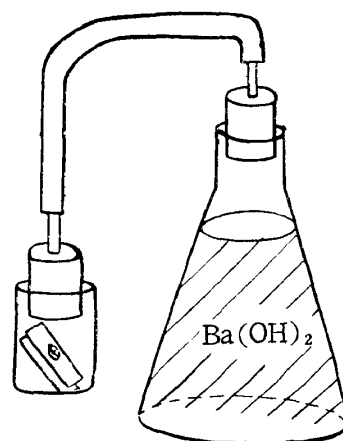
蒸 留 水	100cc
塩化カルシウム	5 g
グルタミン酸	1.0g
水酸化カルシウム	0.25g

上記処方により基液を作製する。水酸化カルシウムとグルタミン酸とは夫々単独では水は溶解難いが、両者を混合すると、塩を形成して溶解する。故に5分～10分間程、これらのほとんどが溶解するまで振盪を続ける。軽度に加温すると、溶解は速かであるが煮沸することは染色上好ましくない。溶解が完了すると pH を 6.8 とする。このためには1/5規定の苛性カリを

1.2～1.5cc 加えた。(以下この液を原液と記す) 原液作製に用いる水酸カルシウム粉末は空気中の炭酸ガスを吸収する故に、封切り後、出来得る限り新しいものを使用する。又原液は実験当日に作製し、口をゴム管で水酸化バリウム槽に連絡しておく。

反応液作製ならびに反応操作

酵素反応操作の直前に原液 10c.c. に炭酸脱



第 一 図

水酵素粉末2mgとグルタチオン1mgを加えた 37° C に加温する。反応槽は直径 2cm 高さ、2cm の硝子容器を使用し、この中に標本を貼布した被覆硝子2枚を裏面を合せて斜立される。開口部は空気

中の炭酸ガスの影響を防ぐため、ゴム管を以つて水酸化バリウム液槽に連絡する。反応時間は15分～5時間まで臓器の種類により適宜選択した。一般に脳は1時間又はそれ以下、その他の臓器は3時間以上が好い染色結果を得られるように思われる。

反応後操作

反応終了後、標本を取り出して、2回水洗し、7～8%流酸銅、水溶液に15分～20分間浸漬し、後2回水洗し、エタノールを通じてから濾紙上で自然乾燥させ、次で硫化水素ガスを通じてある容気内に1～2分放置する。この操作で酵素活性を有する部分は硫化銅の黒色沈澱を形成する。硫化の終った標本は10%～20%のフォルマリン水で固定(5分～15分)し、以後は通常の標本と同様アルコールで脱水して、キシロールで透徹カナダバルサムにて封入を行う。核染色を望む場合はフォルマリン水固定の後純アルコール中20分～30分放置して、脱脂をほどこした後、再び水道水に浸してからヘマトキシリンにて染色することにより目的を達する。

Ⅲ 実験法についての考按

アミノ酸脱炭酸酵素とは、 α アミノ酸を分解して炭酸ガスを発生して基質に相当する一級アミンを形成する反応を触媒する酵素である。この種の酵素に関する組織化学的な証明がなされないのは、 37°C 常圧そして中性附近においては、炭酸ガスを即時に吸収して強固な水に不溶性の沈澱物質を形成させることが困難であること起因する。著者はこの仕事に着手するに先に立ち不溶性の炭酸塩を作る陽イオンについて pH を 7 に矯正した溶液を作成して、その液中に炭酸ガスを通気して沈澱の発生状態を観察した使用した陽イオンは、 Ca^{++} , Sr^{++} , Ba^{++} , Fe^{+++} , Ni^{++} , Co^{++} , Pb^{++} , および陽イオン界面活性剤の一種であるハイアミンについてであったが、そのすべてにおいて即時、沈澱を起したものはなかった。唯一の例外として塩基性酢酸鉛は中性附近で炭酸ガスの通気により沈澱を起すが、この物質は組織に対する親和性が強いことと、しばしば酵素に対して阻害的な作用を有する故に酵素の組織化学的証明の手段として用うことには不適當と思われた。

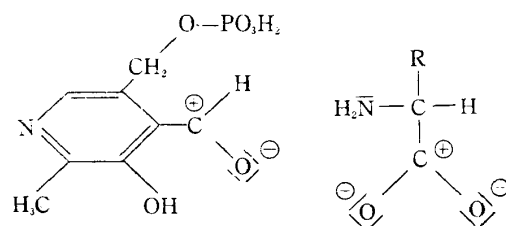
しかしながら、炭酸イオン (CO_3^{--}) は、その金属塩が水に不溶性の沈澱物を形成するものが多く、この性質は、1930年、Sen^{B17)}、1956年、田上^{B19)}, et, al, のウレアーゼ、1949年、中井 et, al, の炭酸脱水酵素の組織化学証明法に用いられ良き結果をおさめている。この方面の成果は脱炭酸酵素の組織化学的証明法を開発する方面においてもその可能性を暗示するものがある。

水溶液内での炭酸素は CO_2 として又は CO_3^{--} HCO_3^- として溶存している。この三者の相互関係は溶液のイオン環境により支配され、とくに水素イオンが強く影響を与えている。さらにイオン環境を変化させた場合、それにとまなうこれら三者の平衡状態の変異の速度は緩徐であることが知られている。 α アミノ酸の脱炭酸過程を考察するにそのカルボキシル基の炭素原子は、それがイオン化した場合においては、隣接する2個の酸素原子のメソメリーの結果、常に潜在的に電子不足の状態となり、陽性の電荷を有することに近い状態にある(図IIのIII。) 補酵素で

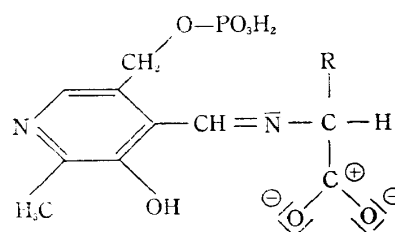
あるピリドキール磷酸が α アミノ基と結合し、Schiff 塩基を形成した状態においてはピリジン核の4位の側鎖の二重結合が共軛しているため電子状態が変化して窒素原子の非共有電子対はピリジン核の方に吸引され易くなる。この効果が隣位の炭素原子におよぶときにはこの α 位の炭素原子も亦電子不足状態となり、潜在的に陽性の荷電状態となるため、カルボキシル基の炭素原子との間に反弾を生じて切れ易い状態とな

第二図 アミノ酸脱炭酸機転の想定

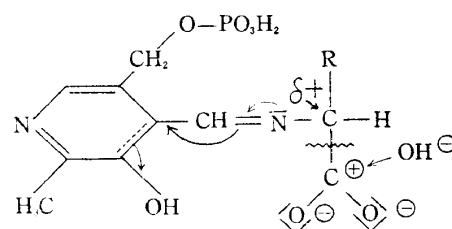
[I]



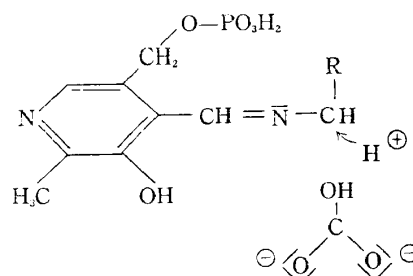
[II]



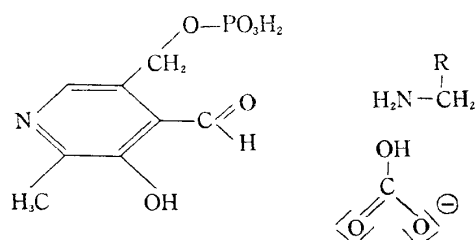
[III]



[IV]



[V]

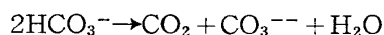


る。この間に、水の分子が関与して H^+ が α 位の炭素に OH^- がカルボキシル基の炭素原子に配向し、次いで炭素間の結合が切れて重炭酸イオンが生ずることが想像される。もし脱炭酸反応が CO_2 の状態で発生するならば組織化学的証明は困難であるが、もし重炭酸イオンの状態で発生するならば、組織化学的証明が可能であることを暗示するといふ得よう。

酵素の活性を組織化学的に証明するに際して終末産物の沈澱の生成状態が不完全であるときには予め終末産物を加えて反応液を不安定にして、この中で酵素反応を行う方法があり、Koelle & Friedenwald^{B12)} はこの方法で、コリンエステラーゼを Burton^{B2)} は、グルクウロニダーゼの組織化学的に証明することに成功している。著者は予め重炭酸ソーダを加えて反応を作成し鋭敏化を試みた。硝酸コバルトとグルタミン酸ソーダは共に単独では水溶液は pH 7 附の反応を示す。しかるに両者を等モル量混合させると pH は酸性に傾く、この溶液はバルビタール酸ソーダの様な弱塩基を加えることにより、溶液の状態を破壊することなく pH を 7.8 までに上昇することができる。この中に予め重炭酸ソーダを加えて、最終的にバルビタール酸ソーダで pH を 7.6 に補正した反応液を作成し、対照としてこの反応液中にヒドロキシラミン 10^{-3} mol を加えた溶液を用い、鼠脳の新鮮凍結切片を 5 時間反応させて両者の比較上著明な発色の差を認めた。他の対照標本（セミカルバチド 10^{-3} mol、基質にグルタミン酸の代りにアスパラギン酸を用いたもの、加熱標本）との間にも著明な発色差を認め、さらにヒドロキシラミンの濃度と阻害との関係を調べたところ $10^{-3} \sim 10^{-5}$ mol/l に終末阻止濃度の存在することを認めた。この事実は昭和 34 年日本病理学会に発表した当時の反応液の処方をごくに記載する。

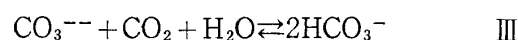
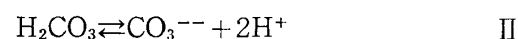
蒸溜水	8.6cc
1mol グルタミン酸ソーダ	0.3cc
1mol 硝酸コバルト	0.2cc
5%重炭酸ソーダ	0.4cc
1/5mol バルビタール酸ソーダ	0.5cc

このようにして本課題に対する曙光を見出したのではあるが、この反応液中には重炭酸イオンがグルタミン酸と等モル近辺にまで混入しているので、もし組織切片内に炭酸脱水酵素が存在しているならば、



なる反応が進行して、ここに発生する炭酸イオンは重炭酸化合物よりはるかに溶解度の低い沈澱を形成する故に炭酸脱水酵素の存在している部をより一層強く染色する可能性が生ずる危懼を免れない。

然しながら炭酸脱水酵素は



の反応の中、I 式をその平衡状態にまで進行する過程に関与する酵素で、これをグルタミン酸反応液の中に加えて標本を反応させるならば終末産物が CO_2 の状態で発生するにしてもあるいは、 HCO_3^- の状態で発生するにしてもその一部分は速かに CO_3^{--} に逆変化させることができることを想定した、ナトリウム塩を除く炭酸塩は重炭酸よりも難溶性である。炭酸系の共存する溶液で、 CO_3^{--} を沈澱する液相を作っておけば反応はつねに CO_3^{--} 形成の方向に進行する。この反応を促進させて、組織から発生する炭酸系をその局部において即時不溶性の炭酸塩として沈澱させる目的で、炭酸脱水酵素を反応液中に添加することを試みた。すなわち 1/20mol の重炭酸ソーダと同量の液量を混和することにより、即時顕著な沈澱を発生させる条件のもとに、コバルト、カルシウム、ストロンチウム、バリウム、の 4 種の金属イオンとグルタミン酸とから溶液を作製し、最終的に苛性カリで pH を 7.4 に補正した溶液を原液とし、この中に炭酸脱水酵素とグルタチオンを添加して反応液を作成し、この液を用いて鼠脳の切片で加熱標本を対照として反応させたところ、カルシウムの例においてのみ対照との比較において発色上著明な差異を認めることができた。

切片上に沈澱したカルシウム塩を発色させるためには、カルシウムを直接発色せしめる方法と、一度他の金属と置換した後、第二の金属を

発色せしめる方法とが知られている。切片をアムモニヤアルカリ性のアリザリンスルホン酸の溶液に浸漬し、種々の時間に互つて検索したが、加熱対照標本との間に差異を認めることができず、発色過程に際し、一旦沈澱したカルシウムイオンが溶出した形跡が認められた。アリザリンスルホン酸の溶液中に種々なカルシウムイオンを沈澱せしめる陰イオン（燐酸、蓚酸、炭酸等）を添加して検討したが好い結果を齎すに至らなかつた。発色前にカルシウムを沈澱させる示薬である燐酸塩、炭酸塩、蓚酸塩、8ヒドロキシキノリン等で定着を試みたが切片上に過剰に非特異的に沈澱を形成したり、あるいは一度沈澱したものが剝離を起したり、あるいは発色を妨げる効果が現われて、目的を達することができなかつた。この方法の他に、組織内に沈着したカルシウムを証明する方法として Von Kossa^{B13)}の方法が知られている。本方法は一般に燐酸カルシウムにのみ特異的に反応するものとして知られているが、Schuscik¹⁶⁾によると非結晶性の炭酸カルシウムは反応を呈するが結晶性の炭酸カルシウムは反応を呈せずとの記載があり、田上はウレアーゼの組織化学的証明法に応用して切片上に折出した炭酸カルシウムの沈澱を発色させている。著者もこの方法に倣つて、反応を終了した切片を蒸留水で洗つてから5%の硝酸銀液の中に入れてタングステン電光下に曝射して黒化を観察した。この標本で見られる発色は、灰黒色で、標本を一面に覆う様に着色し、加熱対照標本との間にも明らかに差異が認められたが、鏡検すると淡い色調で微細な局在を調べることは困難であり、又この発色物を定着させる目的で、チオ硫酸ソーダ溶液内に浸漬したところ褪色が著明であつた。発色物を固定させる目的でフォルマリン水、ハイドロキノン溶液に浸漬したが、前者はチオ硫酸ソーダに依る褪色を防ぐことが出来ず、後者は標本の表面に粗大針状の黒色沈澱物が組織構造とは全く無関係に折出していた。

カルシウムを他種の金属と置換して後硫化を施して酵素の局在を硫化金属の黒色沈澱にて示す方法は鋭敏ではあるが、金属が非特異的に組

織蛋白と結合して発色したり、又色彩が茶褐色を呈し、又本組織内に存在する色素との区別に困難を感ずるため、必ずしも好ましい方法ではないのであるが、本法(カルシウム—基質液法)における沈澱物の染色に対しては標本上の沈着物が脆弱なる故に、上記に試みた方法は何れも失敗に了つたため、この方法について検討することを余儀なくさせられた。置換に使用した金属は銀、水銀、鉛、銅、ニッケル、コバルトであつたが、この中、水銀、ニッケル、コバルトは染色上明瞭な局在を示すことなく、銀はその硫化物の沈澱は深黒色で微細な局在を明瞭に示すが、蛋白質との結合性が強く、かつ反応液中の塩素イオンの影響を組織切片上の沈澱物を破壊することなくして完全に除去することは困難であり、さらに、本質的に嗜銀性の強い臓器では酵素局在を判定することに困難を覚えた。鉛は硫化標本を得るには最も信頼性のある金属イオンで特に3%の硝酸鉛の溶液の中に2~3分間浸漬すると好い結果を得ることができる。しかしながら、これ以上浸漬時間を延長させる組織蛋白と非特異的に結合して対照標本をも染め出す恐れがあり、又硫化鉛の沈澱は鏡検上、黄褐色であり、微細な構造物について検討するには好ましくない、なお硫化鉛は弱酸性の溶液では極めて少量なら溶解するため、カナタバルサムの様な酸性の封入剤を用うると長期保存に耐えることが出来ない。銅の硫化は技術上、鉛に較べてやや不安定な結果を示すが、フォルマリン固定を施すと色調が深くなり、鏡検上明瞭な局在を示した。可溶性の銅の化合物として塩化銅、硫酸銅、酢酸銅、フエーリング示薬について検討したがフエーリング示薬は炭酸塩の沈澱が溶出し全く特異的な発色物を認めず酢酸銅は類脂体を染め出す効果があり、塩化銅と硝酸銅は、発色物の輪郭が不鮮明であり、硫酸銅がもつとも優れた染色効果を示した。著者は主として8%硫酸銅水溶液中15分~20分浸漬の方式を採用し、この他しばしば硝酸鉛法を併用した。

標本上の金属の沈澱を硫化する目的のためには、硫化ソーダの水溶液を用うることが操作上最も簡易であり、脳の標本においては加熱対照

標本に著しい差異を示す様に思われた。しかしながら、脳以外の臓器では硫化ソーダの中に浸すと一旦は標本の表面に著明な黒色の沈澱が出来るが間もなくこの沈澱は剝離して脱落するのが認められる。このことは切片上の折出した炭酸塩の沈澱が脆弱なこと、硫化ソーダの持っている苛性に基くものと思われた。銅の沈澱を強化するために、燐酸塩、砒酸塩、炭酸塩、ロダン塩、ロタン塩、+亜硫酸塩、ロダン塩+ピリジン、フェロシアン塩、安息香酸アンモニウム+ヘキサメチレンテトラミン、8-ヒドロキシキノリン等、種々の Cu^{++} 沈澱剤の水溶液中に浸漬し、後硫化ソーダにて硫化したが、この試みは凡て失敗に了つた。次いで硫化ソーダの苛性を避けて硫化を行う目的で硫化水素ガスの発生装置を作り、ガスの通路に硝子槽を設けて、この中で鉛置換された切片を硫化した。切片が湿潤していると硫化銅が溶出する傾向にあることを認めたので鉛置換された標本を乾燥する必要を生じた。乾燥剤として、メタノール、エタノール、アセトンを用いて検討したところ、エタノールが最も輪郭の明瞭な発色を示した。

以上の検討の結果より得られた方法を、本論文Ⅱ項に記載したが、この方法においても未だ完成の域には達していない、すなわちしばしば切片上に大きな針状の結晶の折出が見られることがあり、染色上、必ずしも美麗なる標本を得ることは出来ないが、検出法としては、比較的安定な染色効果をもたらすことが可能となつたので前項に記載した。

本法により検出される発色沈澱物に対する酵素化学的な検討を加えた。ケトン示薬による阻碍実験については基質液 10cc 中に $1/10\text{mol}$ の塩酸ヒドロキシラミンと塩酸セミカルバチドを苛性カリで pH を、7 に補正した液を 0.1cc 加えて阻碍剤が 10^{-3}mol/l 含有する反応液を作製し脳と肝臓の切片について検討したところ肝臓からは両者共に全く発色沈澱を見ることが出来なかつた。これに反し脳は発色がわずかに減弱しているにとまつた。次いで補酵素添加による影響を調べた。即ち基質液 10cc に対しピリドキサル 燐酸を 3mg 加えて、5分、10分、15

分、20分、30分、45分、1時間と経過を逐つて観察したところ5分反応の標本ですでに、ピリドキサル 燐酸非添加標本に較べ発色が明らかに増加されている事実を認め、30分では、両者の差を顕著に示す結果を得た。これにより本法で発色される沈澱物は脳におけるものでも、その発色沈澱の一部はグルタミン酸脱炭酸酵素の活性に基くものであることが判定された。阻碍剤添加によつても脳の切片の発色が完全に阻止出来なかつたことは、脳組織自身が本質的に金属嗜好性を有していることによること、と思われる、この点についてはさらに一段と述式の改善を試みることを希望するものである。

Ⅳ 大黒鼠における本酵素反応の分布

第二項において記述した理由により現在の段階では染色所見より酵素の局在を決定づけることに就ては仮令加熱標本に对照として充分なる比較を行つたにせよ慎重を期さねばならない。以下本法により数回検討を重ねるが一定した染色性を示すのみを略述するが個々に関する決定的な判断についてはさらに種々な角度から検討されねばならない。

中枢神経系——神経節細胞はおおむね最も強く発色を示す、とくに延髄の核中の神経節細胞は比較的明瞭に原形質内に顆粒として見られる故ニツスル小体に一致するものと思われる。大脳核のものも比較的明瞭な輪郭を示すが、皮質のものは不分明であつた。脈絡膜上皮も強く発色するが膠細胞は弱陽性を示し、これは星芒状膠細胞と思われる。線維成分では膠線維、神経線維共に弱陽性を示す。前者はとくに神経節細胞に連続する部に強く見られる。一般にいつて灰白質に強く、白質に弱く、小脳では顆粒層において最も強く、分子層これに次ぎ、髄質は最も強い、延髄では白質にはほとんど発色は見られない。

肝臓——肝細胞の原形質に粗大な顆粒状に発色が見られる。これは R. N. A. は顆粒に一致するものと思われている。小葉内では特に中心域の細胞に強く発色している。膽管上皮発色せず間質組織および血管もおおむね陰性である。星

細胞は判定が困難である。

腎臓——肝臓に較べ反応は一般に軽度であるが一般に腎上皮は軽度ながら反応を示す様に思われる。特に皮質の上皮の内腔に向う縁の部に稍強く見られる。微弱ではあるが糸絨体内部に星型の島嶼状に反応のあらわれる部を見るがこれは糸絨体の上皮と思われる。他の糸絨体の部は陰性である。

肺臓——気管枝上皮にやや強い反応を示している。肺胞壁にわずかながら微弱に反応を示す小塊が散在しているが、これは肺胞上皮の局在に一致するものと思われる。

脾臓——細網細胞の原形質に最も強く見られ遊走細胞にも軽度に発色している。がいして脾髄に強く濾胞内は弱い、被膜ならびに梁柱は反応を示さない。

心臓——筋原線維に一致して線状にあらわれている。これらの線は反応の強いところと弱いところが交互に配列し、横紋構造に一致している。間質は一般に陰性であるが時として強く発色する線状の物体が見られる。これは神経終末を想像させる。

大腿直筋——ほぼ心筋と同様に発色して居るが、がいして心臓に見られるものより遙かに微弱である。筋鞘の部が特に強く発色することが目立っている。

副腎——皮質の所見は不安定で局在を断定することは困難である。髄質は瀰漫性に弱く発色しており、この中に、ときとして粗大な粒状の強い発色物を見るが、これを神経節細胞に由来するものと判定するまでに至っていない。

消化管——胃上位の扁平上皮は顆粒層と最上層との間に層状に発色が見られる。胃底部では上皮全体がほぼ発色しているが特に基底部のものが強く腸においてもほぼ同様な所見が得られるが、がいして胃におけるものより強く発色している。筋層も微弱ながら発色している様に思われる。

V 結 語

新鮮凍結切片を用いて炭酸脱水酵素とグルタミン酸脱炭酸酵素を組織化学的に証明することを可能ならしめた。この操作で、脳切片を用いてピリドキサル燐酸による賦活作用と、肝臓切片を用いて、ケトン示薬による阻害作用を確認することが出来る。しかしながら脳の切片は本質的に金属イオンに対する親和性が強い

ため、非特異的な発色が見られる。

本文に記載した術式は未だ完成の域に達してはいないが脱炭酸酵素系の研究に曙光を見出したものと信ずる。

謝辞 欄筆するにあたり、本題目についての研究を命ぜられ、かつ指導下された高松教授ならびに援助下された研究室の各位に深甚の謝意を表します。

文 献 (A)

1937~1957年間に発表されたグルタミン酸脱炭酸酵素にかんする文献の総覧

- 1) Awapara, J., A. Landua & B. Seale : Free γ -amino butyric acid in brain. J. Biol. Chem.: **187** 35-39, 1950.
- 2) Axelrod, B., R. Jang & J.M. Lawrence : Glutamic acid decarboxylase of lemons and oranges. J. Agr. Food. Chem.: **3**, 1039-1041, 1955.
- 3) Beeves, A.: L-Glutamic acid decarboxylase from barley. Biochem. J.: **48** 132-137, 1951.
- 4) Bergerettt, B., F. Chtagner & C. Fromageot : Decarboxylation of cysteinsulfinic, cysteic and L-glutamic acid by various rabbit organs. Influence of pyridoxal phosphate and thiol groups. Biochim-et Biophys. Acta.: **22** 329-336, 1956
- 5) Davison, A.N.: Amino acid decarboxylases in rat brain and liver. Biochim. et Biophys. Acta: **19**, 66-73, 1956.
- 6) Davison, A. N.: Mechanism of the inhibition of decarboxylases by isonicotinoyl hydrazide Biochim. et Biophys. Acta: **19**, 131-140, 1956.
- 7) Eggleston, L.V.: Effects of phosphates, arsenates, and nucleostides on L-amino acid decarboxylase. Biochim. J.: **65**, 735-744, 1957.
- 8) Gale, E. F.: The use of specific decarboxylase preparations in the estimation of amino acids in protein analysis. Biochem. J. : **39**, 46-52, 1945.

- 9) Gangadharam, P. R. J. & M. Sirsi: Mode of action of isonicotinoyl acid hydrazide. *J. Indian Inst. Sci.*: **38**.A. 33-42, 1956.
- 10) Grünberger, D., J. Skoda & F. Sörm: Mechanism of antibiotic action. V. Effect of chloranphenicol, chlortetracycline and oxytetracycline on the synthesis of glutamic acid decarboxylase in *E. coli* and tyrosine decarboxylase in *Streptococcus faecalis*. *Chem. Listy.*: **48**. 1711-1712, 1948.
- 11) Hac, L.R.: Decarboxylase. U. S. 2,687,369. Aug. 24, 1954. to International Minerals & Chemical Corp.
- 12) Happold, F.C.: The effect of potassium ion and other univalent cations upon the activity of some enzyme systems whose coenzyme is pyridoxal phosphat. *Congr. intern. biochim., Résumés communs, 3^e Congr., Brussels 1955* 32.
- 13) Hood, S. L.: Glutamic decarboxylase of squash and radish. *Botan. Gaz.*: **116**. 86-92, 1954.
- 14) Hughes, D. E.: Acceleration of bacterial glutamic decarboxylase and glutaminase by cetyl-trimethyl ammonium bromide. *Biochem. J.*: **45**. 325-331, 1949.
- 15) Hughes, D. E.: Effect of surface active agents on bacterial glutamic decarboxylase and glutaminase. *Biochem. J.*: **46**. 231-236, 1950.
- 16) Ishikawa, Y. & Y. Obata: Inhibitor for L-glutamic acid decarboxylase. *Nippon Nōgei Kagaku Kaishi*: **29**. 689-692, 1955.
- 17) Karrer, P. & M. Viscontini: Krystallisiertes synthetisches Pyridoxal acetal phosphate als Co-ferment von L-Aminosäuren-decarboxylase. *Helv. Chim. Acta.*: **30**. 524-528, 1947.
- 18) Kating, H.: The role of γ -amino butyric acid in the metabolism of *endomyces vernalis*. *Naturwissenschaften*: **41**. 188, 1954.
- 19) Killam, K.F. & J.A. Baln: Convulsant hydrazides. I. In vitro and in vivo inhibition of vitamin B₆ enzyme by convulsant hydrazides. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*: **119**. 255-262, 1957.
- 20) Király, Z. & G. L. Farkas: Change of glutamic acid decarboxylase activity in rust infected wheat. *Naturwissenschaften*: **44**. 353, 1957.
- 21) Krishnaswamy, P. R. & K. V. Giri: Occurrence of γ -amino butyric acid, decarboxylase in red yeast. *Current. Sci (India)*: **22**. 143, 1953.
- 22) Krishnaswamy, P. R. & K. C. V. Giri: Glutamic acid decarboxylase in *Rhodotorula glutinis*. *Biochem J.*: **62**: 301-303, 1956.
- 23) Kulkarni, L. & K. Sohoni: Glutamic acid decarboxylase in legumes. *Nature*: **178**. 925, 1956.
- 24) Lichstein, H.C., I. C. Gunsalus & W.W. Umbreit: Function of vitamin B₆ group: Pyridoxal phosphat (Decarboxylase) in transamination. *J. Biol. Chem.*: **161**. 311-320, 1945.
- 25) Ljungdahl, L. & E. Sandegren: Quantitative determination of amino acids in barley, malt, wort and beer. *European Brewery Congr. Proc. Congr.*: 85-97, 1954.
- 26) Mardasev, S. R. & R. N. Etingof: Amino acid decarboxylases from bacteria grown on solid media. *Biokhimiya*: **13**. 469-476, 1948.
- 27) Matsuda, G., Y. Nishida, I. Kita & A. Iwasaki: Influence of various chromatographic agents on the action of glutamic acid decarboxylase. *Nagasaki Igaku zasshi*: **30**. 142-146, 1955.
- 28) Miettinen, J. K. & A. I. Virtanen: Nitrogen metabolism of the alder. The absence of arginase and presence of glutamic acid decarboxylase. *Acta. Chem. Scand.*: **7**. 289-296, 1953.
- 29) Miettinen, J. K. & I. Virtanen: The free amino acid in the leaves, roots and root nodules of the alder. *Physiol. Plantarum.*: **5**. 540-547, 1952.
- 30) Møller, V.: Activity determinations of amino acid decarboxylase in enterobacteriaceae. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*: **34**. 102-114, 1954.
- 31) Møller, V.: Distribution of amino acid decarboxylase in enterobacteriaceae. *Acta Pathol.*

- Microbiol, Scand: **35**.257-277,1954.
- 32) Møller, V.: Simplified tests for some amino acid decarboxylase and arginine dehydrase system. Acta Pathol. Microbiol. Scand.: **30**. 158-172, 1958.
 - 33) Morrison, J.F.: Enzymic mechanism : in the respiration of rhubarb leaves. Australian J. Exptl. Biol. & Med. Sci. : **28**. 311-320, 1950.
 - 34) Najjar, V.A. & J. Fisher: Studies on l-glutamic acid decarboxylase from E. coli. J. Biol. Chem.: **206** 215-219, 1954.
 - 35) Ogasawara, K., S. Sata & S.Watanabe. Etiological Studies on Ekiri, III.Distribution of the amino acid decarboxylases of dysentery bacillus. J. Med. Sci.: **15**. 229-231, 1952.
 - 36) Okunuki, K.: Ueber ein neues enzym, „Glutamino carboxylase“ Botan. Mag. (Tokyo): **51**. 270-278, 1937.
 - 37) Okunuki, K.: Activity group and inhibiting substance of glutamino-carboxylase. Science: **12**. 221, 1942.
 - 38) Okunuki, K.: The active group of glutamic decarboxylase and its inhibitors. Acta phytochim.: **13**. 155-159, 1943.
 - 39) Okunuki, K. & M.Inagaki: Glutamic carboxylase and its physiological significance in brain. Proc. Japan. Acad.: **27**. 658-661, 1951.
 - 40) 奥貫一男, 稲垣稔, 脇坂義治
デルタ ミン酸脱炭酸酵素の炭酸ガス阻害について
酵素化学シンポジウム: **7**. 90-93, 1952.
 - 41) Pfister, K. III. & J.Lanza: 2-Methyl glutamic acid in its salts. U. S. 2,658,912. Nov. 10, 1953.
 - 42) Proom, H. & A.J. Woiwod: Distribution of glutamic acid decarboxylase in the family enterobacteriaceae examined by a simple chromatographic method. J. Gen. microbiol. **5**. 681-686, 1951.
 - 43) Robert, E., S.Frankel & P.J. Harman: Amino acid of Nervous tissue. Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.: **74**. 383-387, 1950.
 - 44) Robert, E. & S.Frankel : γ -Amino butyric acid in brain. Feder. Proc.: **9**. 219, 1950.
 - 45) Robert, E. & S.Frankel: γ -Amino butyric acid in brain; its formation from glutamic acid. J. Biol. Chem.: **187**. 55-63, 1950.
 - 46) Robert, E. & S. Frankel Glutamic acid decarboxylase in brain. J. Biol. Chem. **188**. 789-795, 1951.
 - 47) Robert, E. & S.Frankel. Further studies of glutamic acid decarboxylase in brain. J.Biol Chem: **190**. 505-512, 1951.
 - 48) Robert, E.: Inhibition of bacterial glutamic decarboxylase by hydroxylamine. J. Biol. Chem.: **198**. 495-500, 1952.
 - 49) Robert, E.: Further studies of inhibition of bacterial glutamic decarboxylase. J.Biol Chem.: **202**. 359-367, 1953.
 - 50) Rohrllich, M. & R.Rasmus: γ -Amino butyric acid, a glutamic acid decarboxylase in wheat and rye germ. Naturwissenschaften: **43**. 88, 1956.
 - 51) Rohrllich, M. & R.Rasmus: Glutamic acid carboxylase in cereals: I. Paper chromatographic detection of formation of γ -amino butyric acid. Zschr. Lebensm.-Untersuchg. u. Forschg.: **104**. 313. 3136, 1956.
 - 52) Rohrllich, M. : Glutamic acid decarboxylase in cereals: II. Manometric measurement of glutamic acid carboxylase activity. Zschr. Lebensm.-Untersuchg u.Forschg.: **105**. 189-194, 1957.
 - 53) Rowatt, E.: Amino acid metabolism in the genus Bordetella. J. Gen. Microbiol. **13**. 552-560, 1955.
 - 54) Schales, O., V. Mim & S. Schales : Glutamic acid decarboxylase in higher plants. I. Distribution, preparation of clear solution nature of prosthetic group. Arch. Biochem: **10**. 455-465, 1946.
 - 55) Schales, O. & S. Schales: Glutamic acid decarboxylase of higher plants. II. pH activity curve, reaction kinetics, inhibition by hydroxylamine. Arch. Biochem.: **11**. 155-166, 1946.
 - 56) Schales, O. & S. Schales Glutamic acid decarboxylase of higher plants. III. Enzymic determination of l (+) glutamic acid. Arch. Biochem. **11**. 445-450, 1946.
 - 57) Schales, O. & S. Schales: Decarboxylation and transamination in extract of higher plants. Arch. Biochem. & Biophys.: **69**. 378-389, 1957.

- 58) Shaw, C. & R. H. Clake: Biochemical classification of proteus and providence culture. J. Gen. Microbiol.: **13**. 155-161, 1955.
- 59) Schormüller, J. & L. Leicher: Biochemistry of cheese ripning. XIII. Glutamic acid decarboxylase in ripening souer milk cheese. Zschr. Lebensm-Untersuchg u. Forschg.: **102**. 13-27, 1955.
- 60) Smith, R. D.: Glutamic acid decarboxylase and γ -amino butyric acid in biological systems. Univ microfilms. (Ann.Arbor, Mich.) Publ. No. 21314, 87. pp.
- 61) Sorm, F. & T. Tursty.: Effect on anions on brain glutamic acid decarboxylase. Chem. Listy: **48**. 1403-1408, 1954.
- 62) Steenholt, G., M. Flikke & P. E. Joner: Some properties of amino acid decarboxylase and their mechanisms of action. Corgr. intern. biochem, Résumés, communs, 3^e Congr Brussel. 1955.
- 63) Suzuki, Y. & N. Takakuwa: Decarboxylation of l-glutamic acid in *Scopolia japonica*. Naturwissenschaften.: **44**. 353-354, 1957.
- 64) Umbreit, W.W. & I. C. Gunsalus: Function of pyridoxine derivatives. Arginine and glutamic acid decarboxylase. J. Biol. Chem.: **159**. 333-341, 1945.
- 65) Umbreit, W. W. & P. Heneage: β -Hydroxyglutamic acid decarboxylase. J. Biol. Chem.: **201**. 15-20, 1950.
- 66) Uritani, I., S. Funahashi & T. Akazawa: The metabolism of germinating plants. J. Agr. Chem. Soc Japan.: **27**. 684-688, 842-848, 849-853, 1958.
- 67) Virtanen, A.I., P. Rintana & T. Lainer: Decarboxylation of aspartic acid and glutamic acid. Nature: **142**. 674, 1938.
- 68) Warburg, O., H. Klotzsch. & G. Krippahl: Glutamic acid decarboxylase in *Chlorella*. Naturwissenschaften.: **44**. 235, 1957.
- 69) Werle, E. & S. Brüninghaus: Cysteic and glutamic decarboxylase. Biochem. Zschr.: **321**. 492-499, 1951.
- 70) Wingo, W.J. & J. Awapara: Decarboxylation of l-glutamic acid by brain. J. Biol. Chem:

187: 267-271, 1950.

文 献 (B)

グルタミン酸脱炭酸酵素以外の内容
を参照したもの

- 1) Baddiley, J. & E. F. Gale: Nature; **155**. 727~728, 1945.
- 2) Burton, J. F. & A. G. E. Pearse: Brit. J. Exptl. Path. **33**. 87, 1952.
- 3) Epps, H. M. R.: Biochem. J.: **38**. 242~249, 1944.
- 4) Gale, E. F. & H. M. R. Epps: Biochem. J. **38**. 232~242. 1944.
- 5) Gale, E. F. & H. M. R. Epps: Biochem. J. **38**. 250~256. 1944.
- 6) Girard, A. & G. Sandulescu: Helv. Chim. Acta, **19**. 1095, 1936.
- 7) Gunsalus, I. C. & W. D. Bellamy: J. Biol. Chem. **155**. 357~358, 1944.
- 8) Gunsalus, I. C., W.D. Bellamy & W. W. Umbreit. J. Biol. Chem. **155**. 685~686, 1944.
- 9) Harris, A.S., D. Heyl & K. Folkers: J. Biol. Chem. **154**. 315~316, 1944.
- 10) Hurwitz, J.: J. Biol. Chem. **205**. 935~947, 1953.
- 11) Keilin, D. & T. Mann: Biochem. J.: **34**. 1163~1176, 1940.
- 12) Koelle, G.B. & J. S. Friedenwald: Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med., **70**: 617, 1949.
- 13) Kossa, V. Ziegler's Beitr. **29**. 163. 1901.
- 14) Meldrum, N. U. & F.J. W. Roughton: J. Physiol, **80**. 143~170, 1933.
- 15) 中井憲也, 倉田白章: 日病会誌 **38**, (1~6): 108-1944
- 16) Schuscik: Zschr. f. wiss. Mikr. u. mikr. Tech. **37**: 160, 1920.
- 17) Sen, P.B.: Indian J. Med. Res, **18**. 77~82, 1930.
- 18) Snell, E. E.: J. Biol. Chem. **154**. 313~314, 1944,
- 19) 田上正昭, 浦田隆介, 佐藤公繁, 天川福市: 東京医事新誌, **75**: 467~471, 1956
1944.
- 20) Umbreit, W. W., W. D. Bellamy & I. C. Gunsalus. Arch. Biochem. **7**. 185~199, 1945.
- 21) Werle, E.: Biochem. Zschr; **30** 4201, 1940

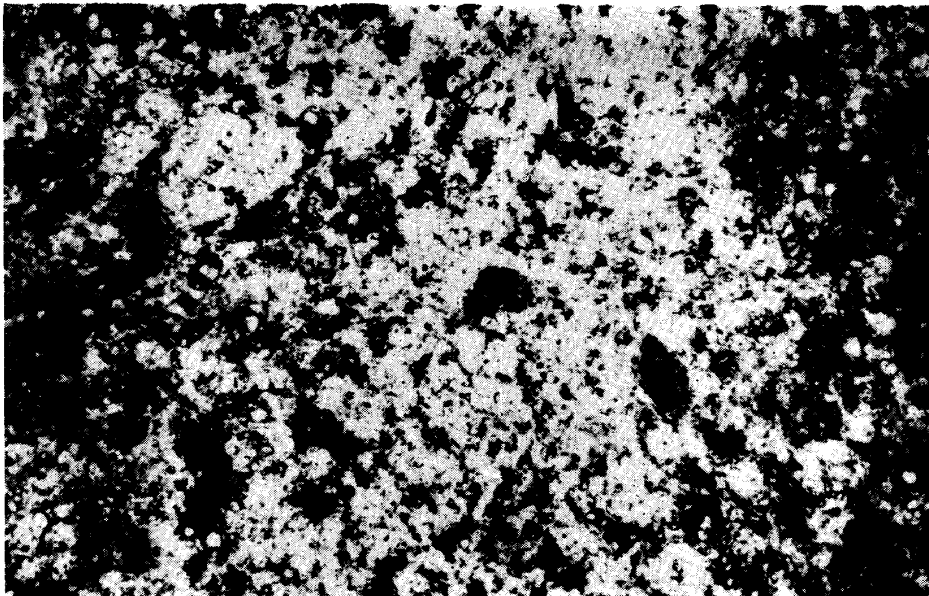


写真1 ねずみ 大脳皮質
深部（右方反応の弱い部
分は白質）

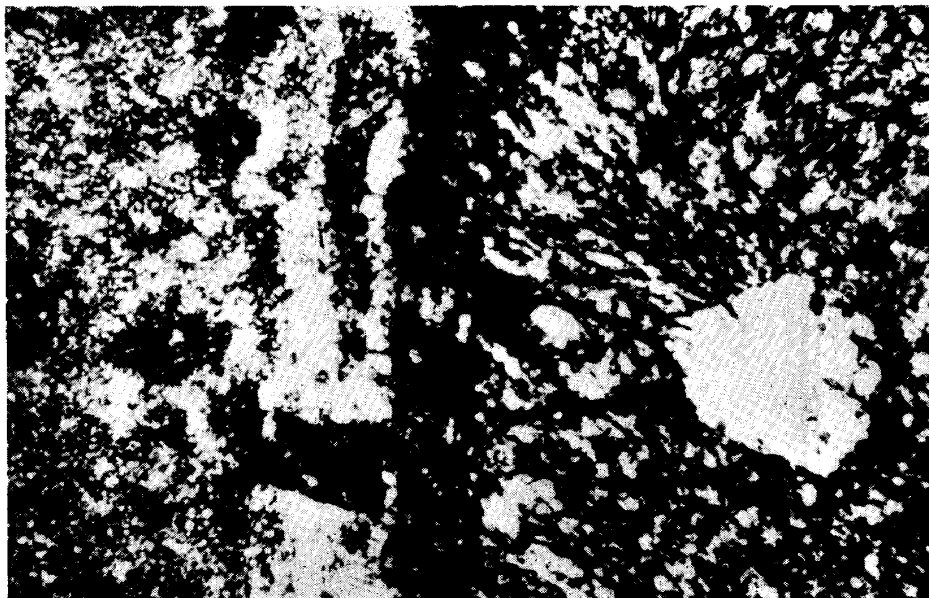


写真2 ねずみ 小脳皮質
（中央の反応の強い部分
は顆粒層，其の左方は
分子層

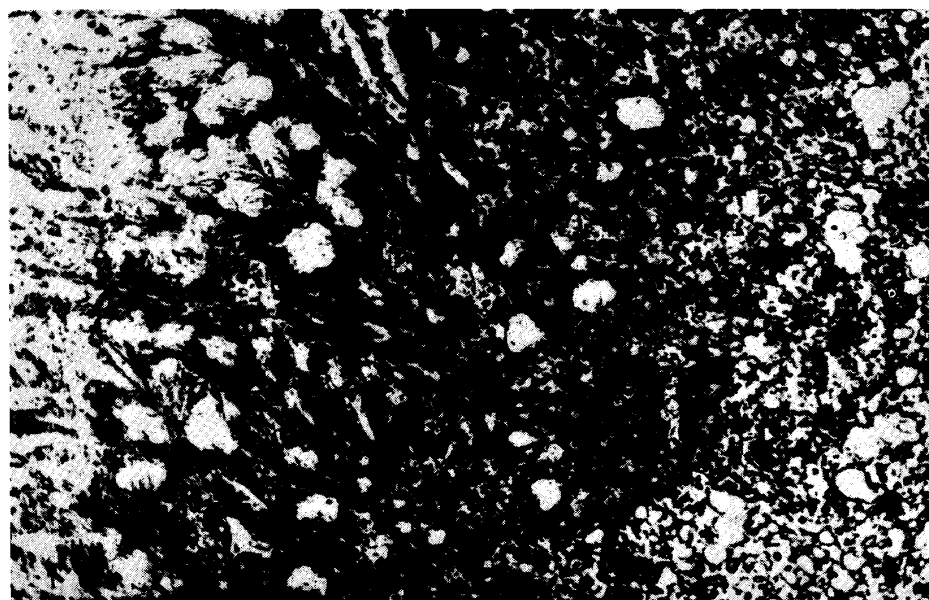


写真3 ねずみ 延髄

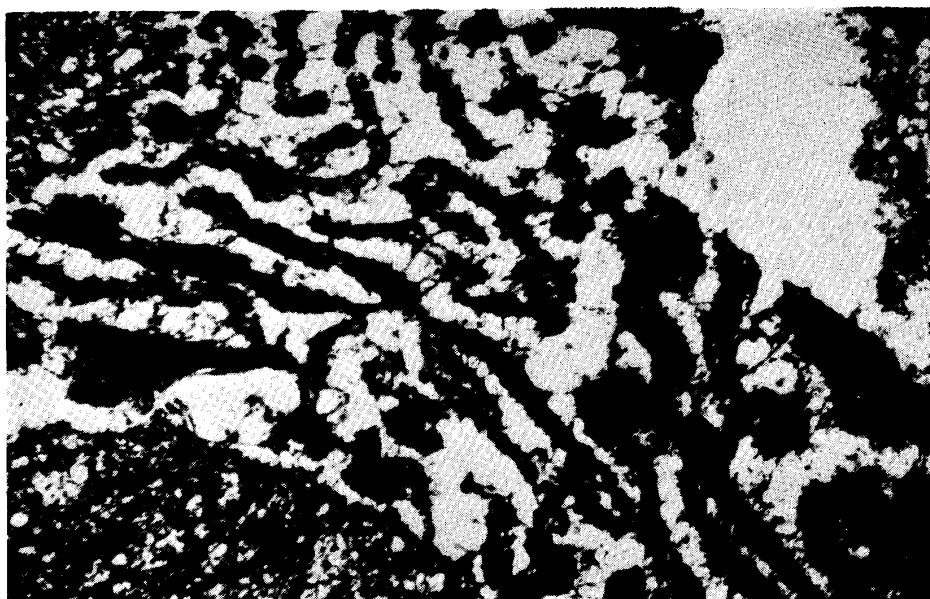


写真4 ねずみ
第四脳室脈絡叢上皮

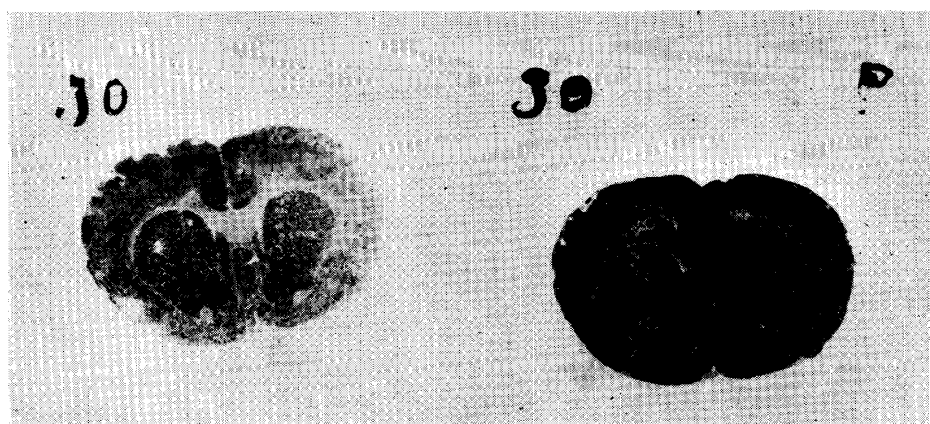


写真5 ねずみ 大脳
右 ピリドキサル燐酸
透加
左 非 添 加
(反応時間30分)

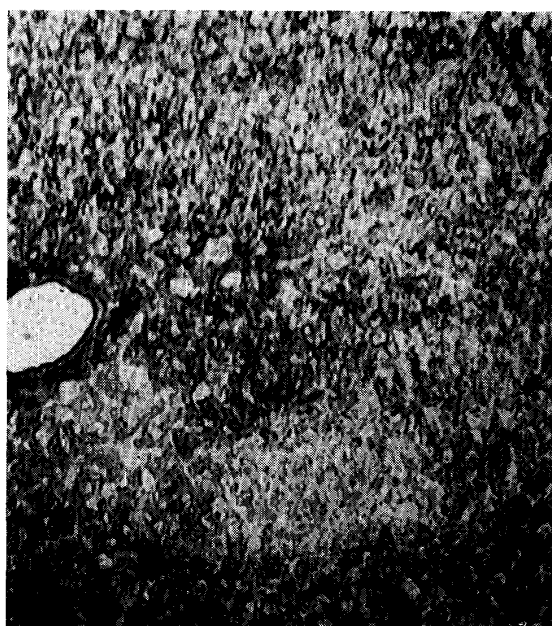


写真6 ねずみ 肝 臓
ヒドロキシラミン $10^{-3}M$ 添加

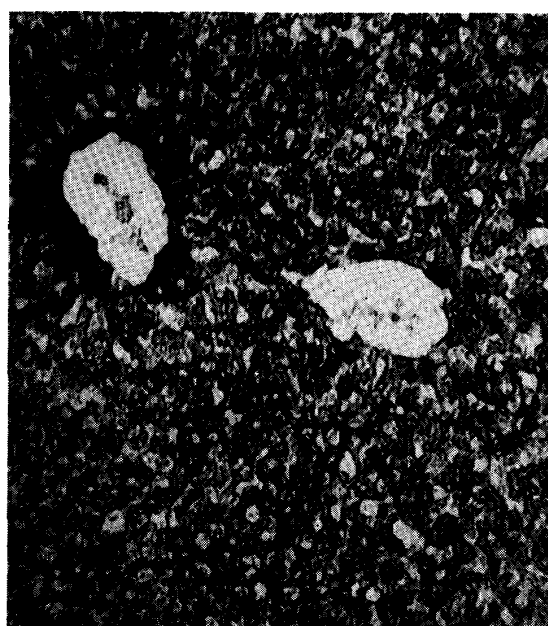


写真7 ねずみ 肝 臓
セミカルバチツド $10^{-3}M$ 添加

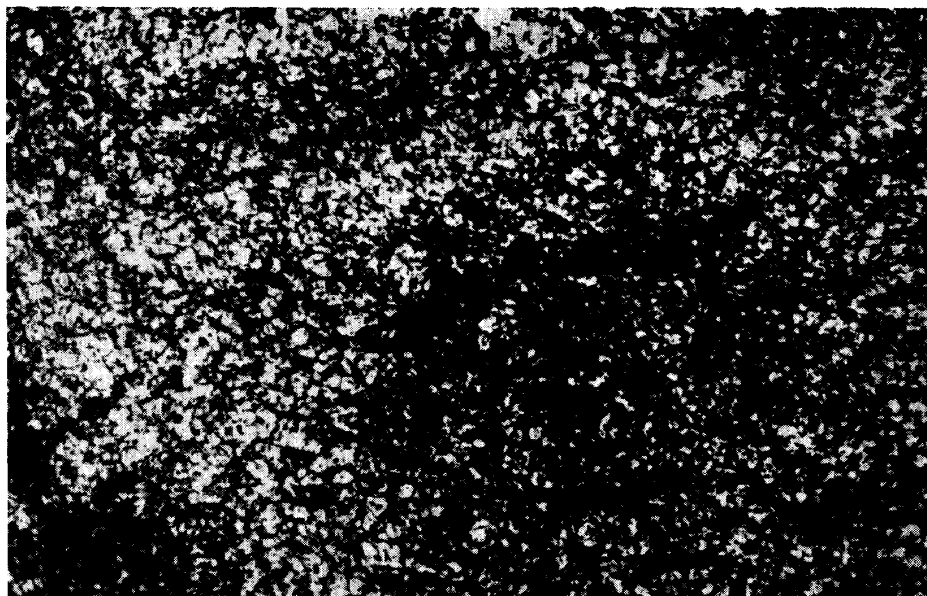


写真8 ねずみ 肝臓
阻 碍 剤 非 添 加 (写 真 7 .
及 び 8 . と 同 条 件 で 反 応 さ
せ た も の)

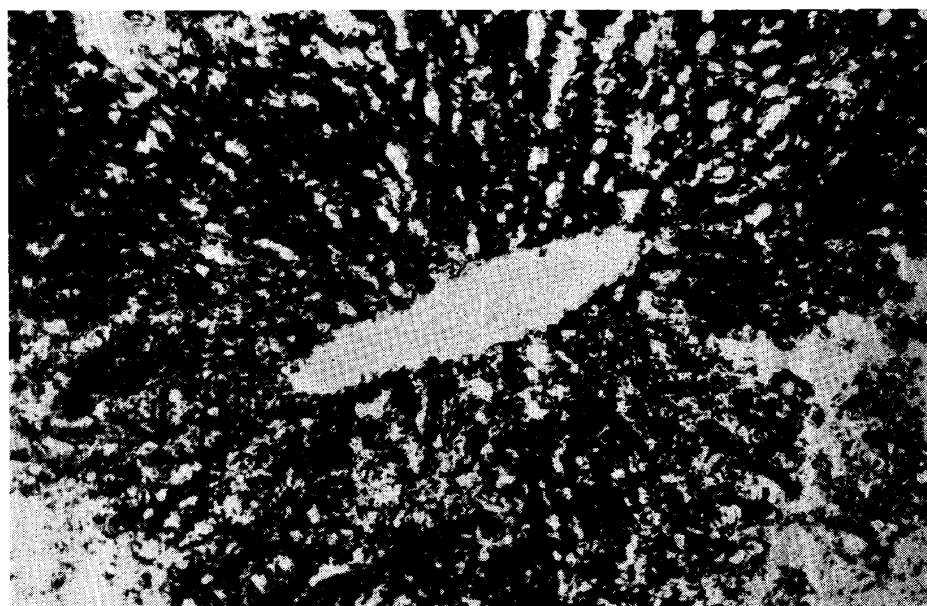


写真9 ねずみ 肝臓
細葉中心部

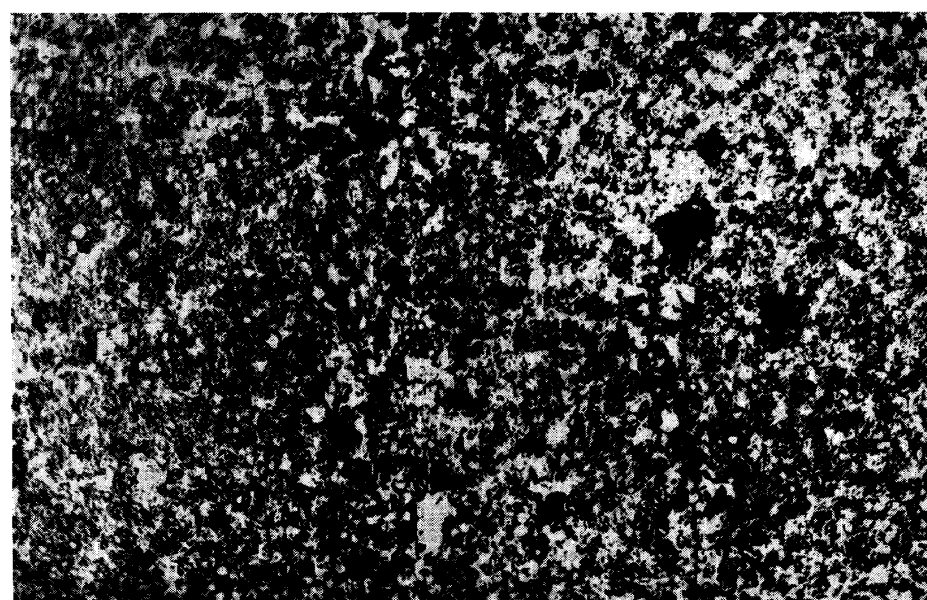


写真10 ねずみ 脾臓



写真11 ねずみ 肺臓

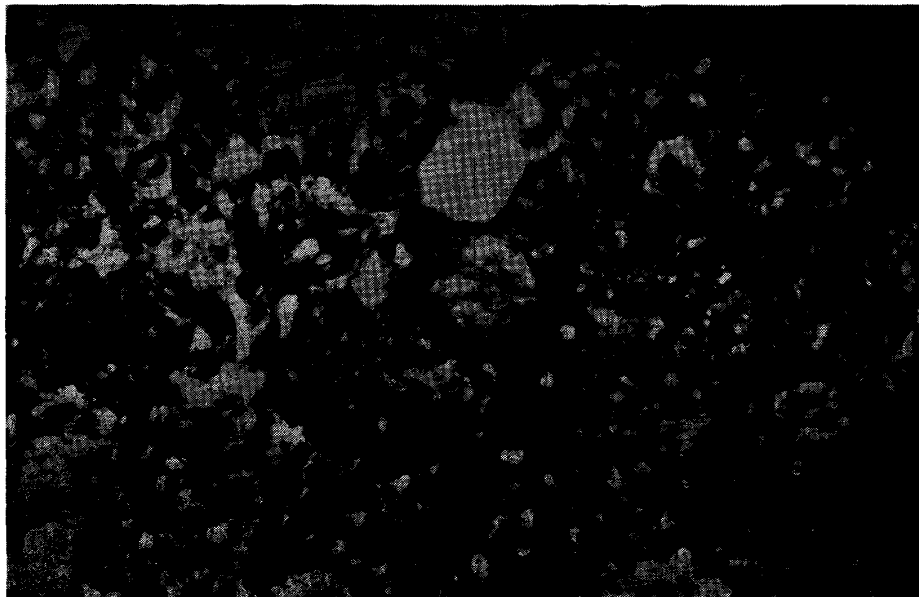


写真12 ねずみ 腎臓

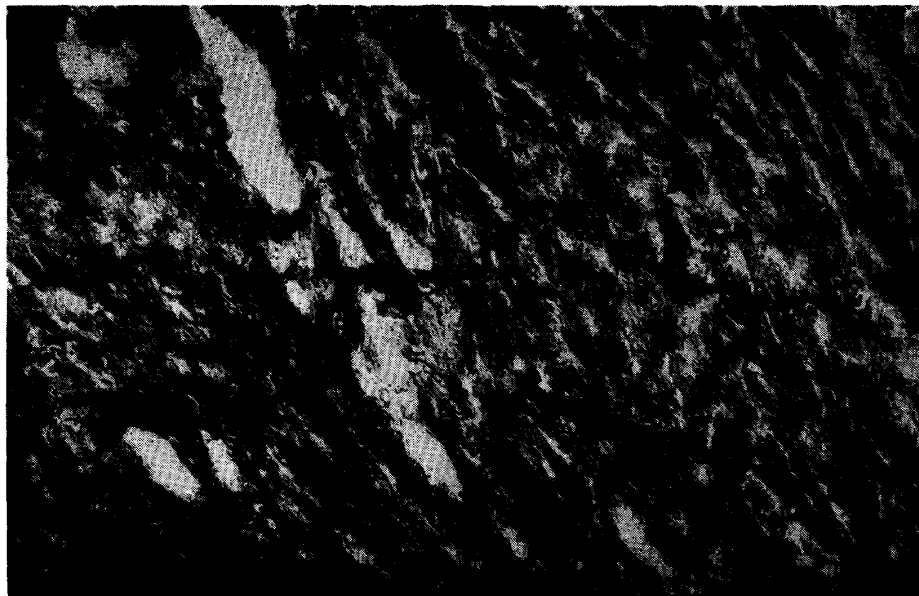


写真13 ねずみ 心臓



写真14 ねずみ 大腿直筋

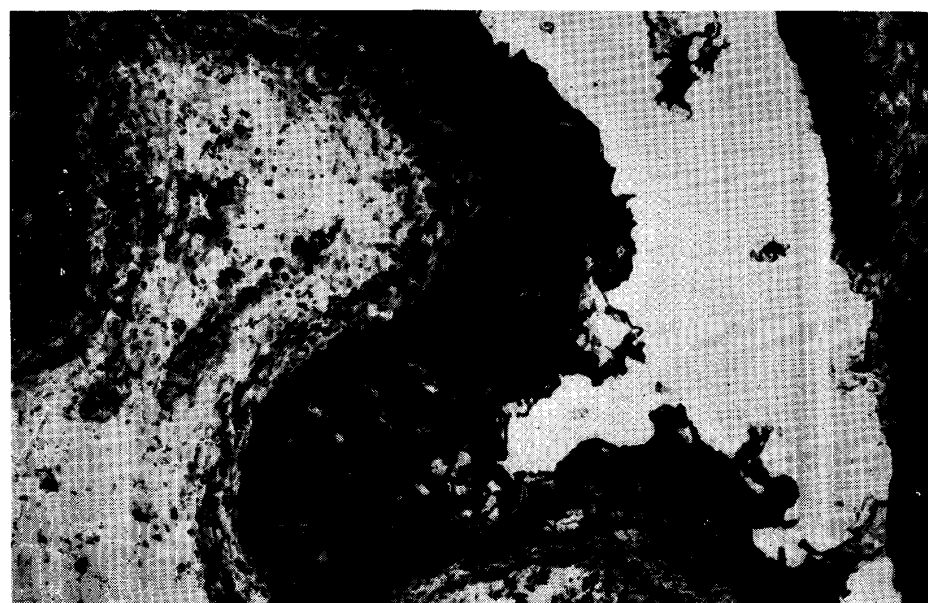


写真15 ねずみ 胃上部
扁平上皮

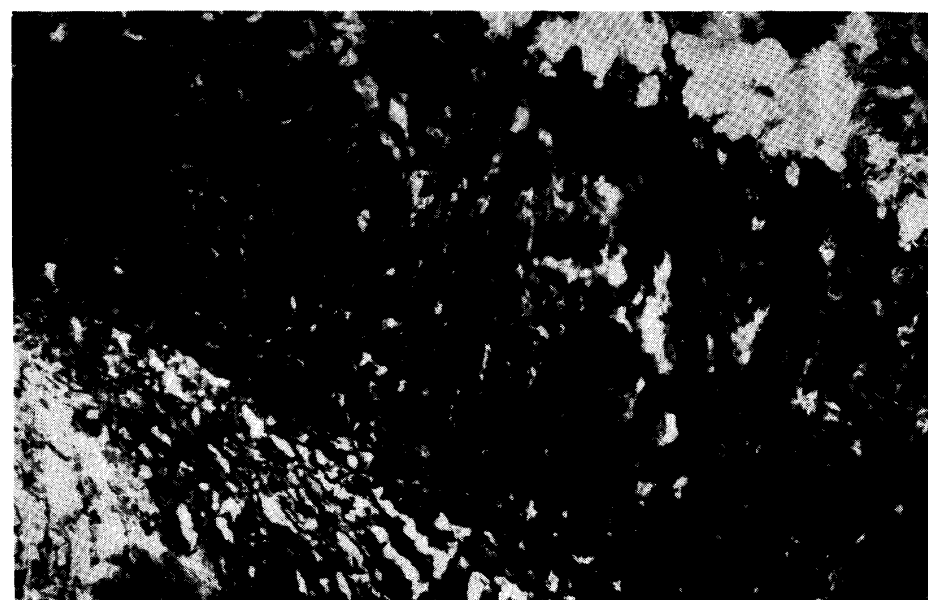


写真16 ねずみ 胃体部